

长链非编码 RNA LINC01006 与非小细胞肺癌顺铂耐药的关系

赵恒宇¹ 吴佳琦² 金舒怡¹ 邱善婷¹ 慕明珊 陆屹松 李晓燕²

1.杭州医学院临床医学院 浙江杭州 310053; 2.杭州医学院基础医学与法医学院 浙江杭州 310053

【摘要】目的 探究 LINC01006 与非小细胞肺癌顺铂耐药的关系。方法 通过 GSE43493 和 GSE108139 数据集筛选参与肺癌顺铂耐药的核心基因,明确核心基因的表达情况。富集分析明确核心基因的生物学功能。探究核心基因的表达差异、诊断效能及预后意义。通过实时荧光定量 PCR 检测 LINC01006 表达。结果 核心基因主要参与磷酸肌醇信号通路及染色体结构的调节,肺癌化疗患者预后不良相关。LINC01006 有一定的诊断效能,在肺癌顺铂耐药细胞中高表达。结论 LINC01006 在非小细胞肺癌顺铂耐药细胞中高表达。

【关键词】肺癌; 非小细胞肺癌; LINC01006; 顺铂; 耐药

The Relationship between Long Non-Coding RNA LINC01006 and the Cisplatin Resistance of Non-Small Cell Lung Cancer

Heng-yu Zhao¹, Xiao-yan Li^{2*}

1. School of Clinical Medicine, Hangzhou Medical College, Hangzhou, Zhejiang 310053, China;

2. School of Basic Medical Sciences and Forensic Medicine, Hangzhou Medical College, Hangzhou, Zhejiang 310053, China

Abstract: Objective To investigate the correlation between LINC01006 and the cisplatin resistance of non-small cell lung cancer (NSCLC). Methods To explore the differential expression of core genes related to cisplatin resistance in NSCLC by analyzing GSE43493 and GSE108139 datasets. And the enrichment analysis was performed to identify the biological functions of these genes. Expression analysis, diagnostic efficacy and the construction of the prognostic models of core genes were based on the TCGA database. Transfected siRNAs targeting LINC01006, and the expression of LINC01006 was detected by real-time fluorescent quantitative PCR. Results Core genes are involved in the regulation of phosphoinositol signal pathway and chromosome structure, and associated with the poor prognosis of lung cancer patients undergoing chemotherapy. LINC01006 has a certain diagnostic efficacy and is highly expressed in cisplatin-resistant cells of NSCLC. Conclusion LINC01006 is expressed at a higher level in cisplatin-resistant NSCLC cells compared to sensitive cells.

Key words: Lung Cancer; Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC); LINC01006; Cisplatin; Drug Resistance

肺癌是发病率最高的癌症,肺癌患者总体的 5 年生存率约为 15%^[1-4]。非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 是最常见的肺癌类型^[1,2]。顺铂 (cisplatin, DDP) 是最常见的铂类药物,然而在治疗中患者容易耐受,因而无法达到预期治疗效果^[5]。因此,寻找肺癌耐药的靶点是肿瘤研究领域亟待解决的问题。LINC01006 定位于 7q36.37。Yu Zhang 等^[6]研究表明, LINC01006 能介导 miR-129-2-3p 靶向连蛋白 β 1 (catenin beta 1, CTNNB1) 而活化 Wnt/β-catenin 信号通路从而促进肺癌的迁移和增殖。

目前,尚未有文献报道 LINC01006 与肺癌顺铂耐药的关联。本研究

将探讨 LINC01006 表达情况与肺癌顺铂耐药的关系,以期待为肺癌耐药的临床治疗提供新的策略。

1 材料和方法

1.1 主要材料与试剂

肺癌细胞 A549 及 A549 顺铂耐药细胞 A549/DDP 购自盈湾生物。A549 细胞使用含有 10% 胎牛血清的 R1640 完全培养基培养。A549/DDP 使用含有 1 μg/ml DDP 的完全培养基培养。胎牛血清购自默克公司, R1640 培养基、Lipofectamine 2000 和 TRIZol 购自赛默飞公司,引物购自北京擎科公司,逆转录试剂盒、SYBR Green 实时荧光定量 PCR 试剂盒和细

胞计数试剂盒-8 (CCK8) 购自翌圣公司, LINC01006 小干扰 RNA 公司 (序列见表 1)。

(si-LINC01006)、阴性对照 (si-NC)、阳性对照 (si-GAPDH) 购自吉玛

表 1 靶向 LINC01006 的小干扰 RNA 序列

名称	正义链	反义链
si-LINC01006 #1	GCAGGGUCUAAAGAAAUUATT	UAAUUUCUUUAGACCCUGCTT
si-LINC01006 #2	GGGCUCAGUAAGUAGACUTT	AGUCUACUUAUCUGAGCCCTT
si-LINC01006 #3	CAGCCUUUCUUCACGCAAATT	UUUGCGUGAAGAAAGGCGTT

1.2 生物信息学分析

并使用 ggplot2 进行可视化。使用曲线下面积 (Area Under the Curve, AUC)

1.2.1 数据集下载与预处理

评估基因的诊断价值。

使用 R 软件的 GEOquery 包和 AnnoProbe 包从基因表达综合数据库 (GEO) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) 下载包含肺癌及肺癌 DDP 耐药细胞测序数据的数据集 GSE43493 与 GSE108139, 进行基因 ID 的注释, 并使用 GEO2R 绘制 GSE43493 数据集基因表达火山图。从癌症基因组图谱计划 (TCGA) (<https://portal.gdc.cancer.gov>) 下载肺癌项目的数据, 并对基因表达数据进行归一化处理。

1.3 CCK8 法检测细胞的耐药指数

以 6000 个/孔的密度将细胞种于 96 孔板中, 次日按照 0–25 μ g/ml 的浓度梯度加入顺铂, 加药 24h 后, 加入 CCK8 溶液继续培养 2h, 使用酶标仪测定 450nm 波长处的吸光度。使用 R 软件 drc 包拟合模型并计算半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC₅₀), 使用 ggplot2 包进行可视化。将 A549/DDP 细胞与 A549 细胞的 IC₅₀ 值相除即可得到 A549/DDP 细胞的耐药指数。

1.2.2 目标基因筛选与表达差异分析

筛选 GSE43493 数据集中 $|\log(FC)| > 1.4$ 且 $p < 0.01$ 的基因, 筛选 GSE108139 数据集中 $|\log(FC)|$ 数值排名前 1000 的基因, 取上述两数据集筛选出的基因的交集。

1.4 细胞转染

使用 Lipofectamine 2000 将 si-NC、si-LINC01006 和 si-GAPDH 分别进行转染, 转染后 72 小时提取中 RNA, 使用实时荧光定量 PCR 检测 siRNA 靶向基因的效果。

1.2.3 交集基因的生存分析及富集分析

提取从 TCGA 中下载的接受过化疗的 288 位患者的信息, 使用 R 软件 survival 包采用多因素 Cox 回归, 分别使用无进展生存期 (Progress Free Survival, PFS) 和疾病特异性生存期 (Disease Specific Survival, DSS) 作为预后指标, 纳入筛选出的基因, 构建预后模型。计算每个样本的个体危险分数, 以 288 个样本的危险分数的中位数将患者分为高风险和低风险两组, 并进行生存分析。使用 R 软件的 clusterProfiler 包进行富集分析, 并 ggplot2 包进行可视化。

1.5 实时荧光定量 PCR 检测 LINC01006 表达

使用 TRIZol 法提取细胞的总 RNA, 使用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA, qPCR 使用 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 试剂盒, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算 LINC01006 的相对表达量。

引物序列为: LINC01006-F: GTGTGACACATCGGACTGAATTGAG; LINC01006-R: AACCTGCACTATTTGTGGCGT; GAPDH-F: TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTGCT, GAPDH-R: CATGTGGGCCATGAGGTCC ACCAC。

1.2.4 诊断效能分析

提取从 TCGA 的 LINC01006 表达数据及患者临床信息, 绘制接受者操作特征曲线 (Receiver Operating Characteristic, ROC) 以评估 LINC01006 表达差异对于肺癌的诊断效能。使用 R 软件的 pROC 包进行 ROC 分析,

1.6 统计学分析

本文数据使用 R 软件 (4.0.3 版本) 进行分析, 进行双尾检验, 且设置显著性水平 $\alpha = 0.05$ 。

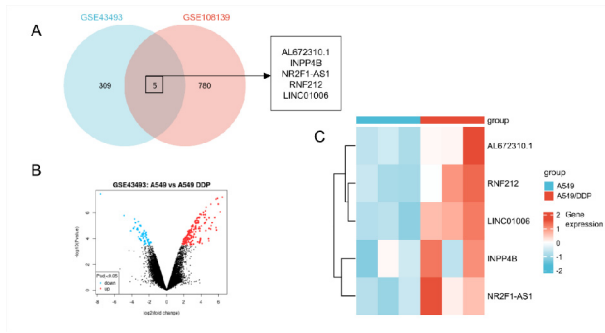


图1 目的基因筛选与表达分析

2 结果

2.1 交集基因的筛选结果与表达差异分析

本研究通过筛选得到了5个交集基因(图1A), 热图表明交集基因主要在 A549/DDP 细胞中高表达, 而在 A549 细胞中低表达, 且 LINC01006 在 A549/DDP 中高表达(图1C)。使用火山图可视化 GSE43493 中差异表达的基因(图1B)。

(A) GSE43493 和 GSE108139 数据集部分交集基因; (B) 使用火山图可视化 GSE43493 数据集中表达差异的基因; (C) 使用热图可视化交集基因在 GSE43493 中的不同分组中表达。

2.2 交集基因的表达、富集及生存分析

交集基因中 AL672310.1、LINC01006 在肺癌组织中高表达(图2A), 其中 LINC01006 在肺癌组织中表达显著高于癌旁组织 ($p < 0.001$)。交集基因的主要涉及磷酸肌醇信号通路和染色体的结构的调节(图2B)。将 PFS 作为预后模型的预后参数时, 高风险组患者的 PFS 与低风险组的 PFS 之间的差异有统计学意义 ($p < 0.01$)(图2C), 高风险组比低风险组的中位生存期短了 1.9 年; DSS 作为预后参数时, 危险分数计算公式为: 风险分数 = $2.8747 \times \text{AL672310-1} + 0.1952 \times \text{INPP4B} + 0.0458 \times \text{NR2F1-AS1} + 0.0154 \times \text{RNF212} + 0.0547 \times \text{LINC01006}$, 说明核心基因高表达提示肺癌化疗患者预后不良。

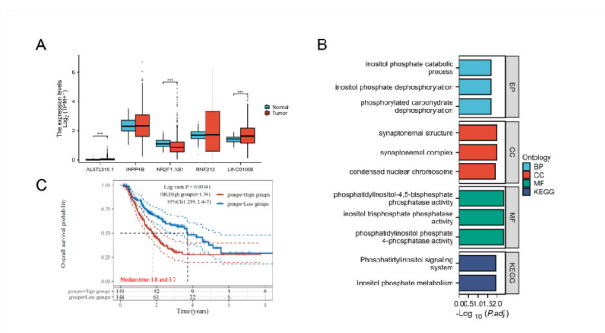


图2 交集基因的表达、富集及生存分析

(A) 交集基因在肺癌及癌旁组织中的表达情况; (B) 交集基因的富集分析; (C) 基于 Cox 回归危险分数分组的无进展生存期的 Kaplan-Meier 曲线图。 (** $p < 0.001$)

2.3 LINC01006 的表达及诊断效能分析

肺癌组织中 LINC01006 表达显著高于癌旁组织(图3A) ($p < 0.001$)。ROC 曲线的 AUC 值为 0.619, 提示 LINC01006 具有一定诊断价值(图3B)。

(A) LINC01006 在肺癌组织中表达显著高于癌旁组织 ($p < 0.001$); (B) 肺癌 LINC01006 基因的 ROC 曲线, 曲线下面积为 0.619。 (** $p < 0.001$)

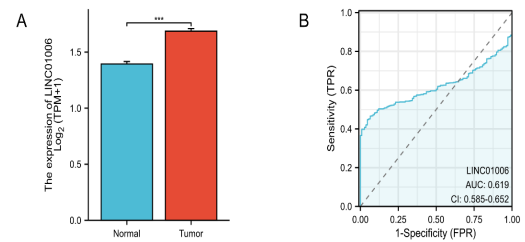


图3 LINC01006 基因的表达及诊断效能分析

2.4 LINC01006 在肺癌顺铂耐药细胞中高表达

A549 细胞的 IC₅₀ 为 2.96 $\mu\text{g/ml}$, A549/DDP 细胞的 IC₅₀ 为 12.14 $\mu\text{g/ml}$, 耐药指数为 4.10(图4A)。LINC01006 在 A549/DDP 中表达高于 A549 细胞 ($p < 0.01$)(图4B)。3 组不同序列的 siRNA 沉默 LINC01006, si-LINC01006 #3 有较好的沉默效果, 其表达显著低于 si-NC 组 ($p < 0.001$)(图4C)。GSE43493 数据集中, LINC01006 在 A549/DDP 中表达高于 A549 细胞 ($p < 0.01$)(图4D); GSE108139 数据集中, LINC01006 的平均相对表达量在 H460/DDP 中高于 H460 细胞(图4E)。

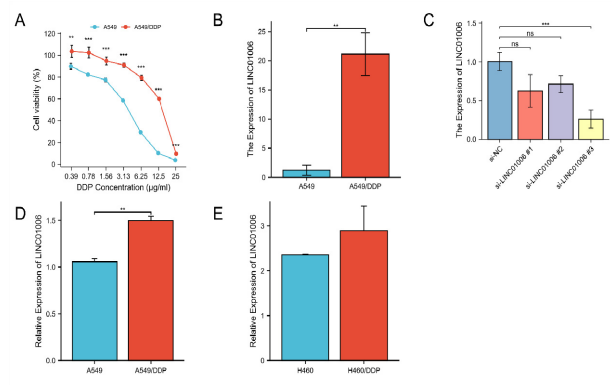


图4 LINC01006 在肺癌顺铂耐药细胞中高表达

(A) A549 与 A549/DDP 细胞生存曲线; (B) LINC01006 在 A549/DDP 中表达显著高于 A549 细胞 ($p < 0.01$); (C) 使用 siRNA 沉默后 LINC01006 的表达; (D) LINC01006 在 GSE43493 数据集中的表达; (E) LINC01006 在 GSE108139 中的表达。(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, nc 表示差异无统计学意义)

3 讨论

肺癌是中国发病率最高的恶性肿瘤,大部分患者在确诊后 5 年内死亡^[1, 2, 7]。LINC01006 是近年来新发现的一种长链非编码 RNA,在肿瘤中发挥着重要作用,但在肺癌细胞中的耐药作用尚未得到研究。

本研究通过 GEO 数据库筛选出了在肺癌顺铂耐药细胞中高表达的核心基因;通过结合 TCGA 数据库,明确了基因在肺癌及癌旁组中的表达;通过富集分析,明确了核心基因聚焦于磷酸肌醇信号通路及染色体结构的调节;通过构建预后模型,探究了核心基因高表达提示预后不良。同时,实验明确了 LINC01006 在 A549/DDP 中高表达,并初步筛选出了对 LINC01006 有靶向作用的 siRNA。

本研究确定了 LINC01006 在肺癌顺铂耐药细胞中高表达,探究了 LINC01006 高表达提示患者预后不良。但由于课题结题时间限制,本研究仍缺乏实验来验证在顺铂耐药细胞中敲低 LINC01006 基因对于细胞活力及耐药情况的影响。因此,我们后续将构建敲除 LINC01006 基因的 DDP 耐药细胞模型,并进一步探究 LINC01006 与肺癌耐药的机制,从而为肺癌研究提供理论参考。

参考文献:

[1]LIANG W, HE J, SHEN Y, 等. Impact of Examined Lymph Node Count on Precise Staging and Long-Term Survival of Resected Non-Small-Cell Lung Cancer: A Population Study of the US SEER Database and a Chinese Multi-Institutional Registry.[J/OL]. Journal of clinical oncology :official journal of the American Society of Clinical Oncology, 2017, 35 (11) : 1162-1170. DOI: 10.1200/JCO.2016.67.5140.

[2]KADARA H, CHOI M, ZHANG J, 等. Whole-exome sequencing and immune profiling of early-stage lung adenocarcinoma with fully annotated clinical follow-up.[J/OL]. Annals of oncology : official journal

of the European Society for Medical Oncology, 2017, 28 (1) : 75-82.

DOI: 10.1093/annonc/mdw436.

[3]SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, 等. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries.[J/OL]. CA: a cancer journal for clinicians, 2021, 71 (3) : 209-249. DOI: 10.3322/caac.21660.

[4]INAMURA K. Clinicopathological Characteristics and Mutations Driving Development of Early Lung Adenocarcinoma: Tumor Initiation and Progression.[J/OL]. International journal of molecular sciences, 2018, 19 (4) . DOI: 10.3390/ijms19041259.

[5]荣辉,程蒙蒙,余明金,等. 复方苦参注射液联合铂类一线化疗方案对非小细胞肺癌患者的临床疗效[J]. 中华肺部疾病杂志(电子版), 2021, 14 (1) : 98-100.

[6]ZHANG Y, LIU H, ZHANG Q, 等. Long Noncoding RNA LINC01006 Facilitates Cell Proliferation, Migration, and Epithelial-Mesenchymal Transition in Lung Adenocarcinoma via Targeting the MicroRNA 129-2-3p/CTNNB1 Axis and Activating Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway[J/OL]. Molecular and Cellular Biology, 2021, 41 (6) : e00380-20[2023-03-25]. <https://doi.org/10.1128/MCB.00380-20>. DOI: 10.1128/MCB.00380-20.

[7]国家卫生健康委办公厅. 原发性肺癌诊疗指南(2022年版)[J/OL]. 协和医学杂志, 2022, 13 (4) : 549-570[2023-03-25]. https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=3uoqIhG8C44YLTlOAIrTKibYIV5Vjs7j7TKGjg9uTdeTsOI_ra5_XTAxoc5fNT_pQZQ1fpBSjbOeId3EEVybDp0fkmtGnI3V&uniplatform=NZKPT.

作者简介: 1.赵恒宇(2001-),男,四川泸州,临床医学专业2019级学生,主要从事肿瘤分子生物学研究;

2.李晓燕(1982-),女,山东淄博人,助理研究员,博士,主要从事肿瘤分子生物学研究。

注:基金项目:浙江省大学生创新创业训练计划(S202213023085);浙江省基础公益研究计划项目(LGF22H080016)。